

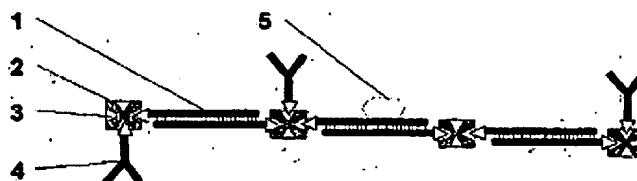
Use of oligomeric conjugates of nucleic acids and proteins as immunoassay reagents, especially as labels that can be amplified by polymerase chain reaction

Patent number: DE19941756
Publication date: 2001-03-08
Inventor: NIEMEYER CHRISTOF (DE); ADLER MICHAEL (DE);
BLOHM DIETMAR (DE)
Applicant: NIEMEYER CHRISTOF (DE)
Classification:
- **international:** (IPC1-7): C07K14/435; A61K49/00; C12Q1/68
- **europaean:** C12Q1/68D4
Application number: DE19991041756 19990902
Priority number(s): DE19991041756 19990902

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19941756

Using oligomeric conjugates (I) of nucleic acids and proteins, as immunoassay reagents, is new. Independent claims are also included for the following: (1) a competitive immunoassay in which the detection molecule, which is coupled to a binding molecule, is incubated with (I) and immuno-PCR (polymerase chain reaction); (2) use of (I) for detecting nucleic acids; (3) use of (I) as amplifying reagents in assays based on optical or gravimetric methods; (4) use of (I) as labeling reagents in electron microscopy and other imaging techniques, e.g. as contrast agents or radiodiagnostic agents for medical use; and (5) use of (I) as therapeutic agents, e.g. radiotherapeutic agents or cytostatics.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 41 756 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 199 41 756.3
㉑ Anmeldetag: 2. 9. 1999
㉒ Offenlegungstag: 8. 3. 2001

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/435
A 61 K 49/00
C 12 Q 1/68

DE 199 41 756 A 1

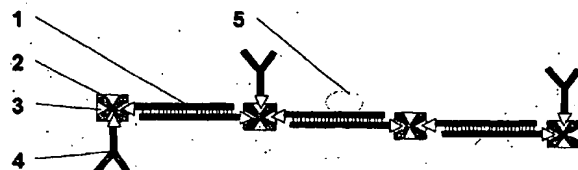
⑦① Anmelder:
Niemeyer, Christof, Dr., 28211 Bremen, DE

⑦② Erfinder:
Niemeyer, Christof, 28211 Bremen, DE; Adler,
Michael, 27607 Langen, DE; Blohm, Dietmar, Prof.
Dr., 27711 Osterholz-Scharmbeck, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten als Reagenzien für immunologische Nachweisverfahren insbesondere die Immuno-PCR

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Komplexen als Reagenzien für immunologische Nachweisverfahren, insbesondere die Immuno-PCR. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate sind eine Gruppe von neuen oligomeren chemischen Strukturen, die hier der Einfachheit halber am Beispiel oligomerer DNA-Streptavidin-Aggregate dargestellt werden (siehe Zeichnung). Durch Umsetzung von mit zumindest zwei Bindemolekülen (z. B. Biotin) markierten DNA-Fragmenten (1) und für das Bindemolekül spezifischen Proteinen (z. B. Streptavidin 2) entstehen oligomere Molekülaggregate. Sie enthalten in ihren Randbereichen freie Bindungsstellen (3), die sich zur Ankopplung von weiteren Bindemolekül-derivatisierten Modulatormolekülen, wie z. B. Antikörpern (4), eignen. Die hierdurch zugänglichen oligomeren Molekülkomplexe eignen sich in vielfältiger Form für den Antigen-Nachweis, insbesondere sind sie bei der Immuno-PCR mit großem Vorteil einsetzbar. Die oligomeren Molekülkomplexe eignen sich als Hilfsmittel zur Signalverstärkung bei biochemisch-analytischen Verfahren zum Nachweis von Antigenen, aber auch als definierte molekulare Marker sowie zur hochselektiven Vergrößerung molekularer Massen im Rahmen optischer, bildgebender oder schwingungsabhängiger Methoden. Außerdem kann eine Funktionalisierung der oligomeren Molekülkomplexe durch Umsetzung mit weiteren spezifisch-bindenden Molekülen, wie z. B. DNA-selektiven Diaminoplatinkomplexen (5), erfolgen, ...



DE 199 41 756 A 1

Aufgabenstellung

Verfahren zur Verknüpfung spezifischer Primärantikörper und Marker-DNA, um immunologische Nachweisverfahren, insbesondere die Immuno-PCR, als einfache "Eintopf-Reaktion" durchführen zu können.

Stand der Technik

Proteine und andere Antigene werden in zahlreichen Verfahren der biomedizinischen, insbesondere der virologischen Routinediagnostik sowie in weiten Bereichen der biologischen Forschung mit Hilfe immunologischer Methoden nachgewiesen. Durch die übliche Kopplung spezifischer Antikörper an nachgeschaltete biochemische Verstärker-Reaktionen werden mit kommerziellen Systemen typischerweise Sensitivitäten bis in den Attomol-Bereich ($1 \text{ amol} = 1 \times 10^{-18} \text{ Mol}$) hinein erreicht. Durch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Verstärker-Reaktion können Proteine neuerdings mit einer Nachweisgrenze von bis zu $6 \times 10^{-22} \text{ Mol}$ erfaßt werden [T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, Science 1992, 258, 120]. Bei dieser sogenannten Immuno-PCR wurde Rinderserum-Albumin (BSA) als Antigen-Modellschubstanz in Mikrotiterplatten immobilisiert, mit spezifischen Antikörpern markiert und in einem nachfolgenden Inkubationsschritt durch Verwendung eines rekombinanten Proteinchimären aus Protein A und Streptavidin mit einem biotinylierten DNA-Fragment verknüpft. Der anschließende PCR-Nachweis des immobilisierten DNA-Markers erlaubte die erwähnte Steigerung der Empfindlichkeit um das etwa 10.000-fache. Dieses Verfahren war zunächst schwer reproduzierbar, wird aber inzwischen nach einigen Modifikationen mit großem Erfolg eingesetzt [C. M. Niemeyer, D. Blohm, Nachr. Chem. Techn. Lab. 1996, 44, 481]. Beispielsweise stellten Zhou et al. 1993 den signalerzeugenden Komplex in der Immuno-PCR durch sequentielle Inkubation aus den Einzelkomponenten her, indem an den antigenspezifischen Primärantikörper zunächst ein biotinylierter Sekundärantikörper, dann Streptavidin und, erst anschließend daran die biotinylierte Marker-DNA gebunden wurde [H. Zhou, R. J. Fisher, T. S. Papas, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 6038]. Auf diese Weise kann die Immuno-PCR zwar mittels kommerziell erhältlichen Reagenzien durchgeführt werden, jedoch wird ihre Empfindlichkeit aufgrund der vielen Kopplungsschritte wesentlich verschlechtert und ihre praktische Durchführung sehr erschwert. In jüngster Zeit wurde gezeigt, daß zum Erreichen maximaler Sensitivität die Primärantikörper in möglichst wenig Reaktionsschritten mit der Marker-DNA verknüpft werden sollten [C. M. Niemeyer, M. Adler, D. Blohm, Anal. Biochem. 1997, 246, 140]. Beispielsweise kann dies durch die direkte kovalente Verknüpfung des Antikörpers mit der Marker-DNA erreicht werden [E. R. Hendrickson, T. M. Hatfield, T. M. Truby, R. D. Joerger, W. R. Majarian, R. C. Ebersole, Nucleic Acids Res. 1995, 23, 522]. Nachteilig an letzterem Verfahren ist allerdings, daß die Herstellung solcher IgG-DNA-Direktkonjugate mit sehr hohem Kosten- und großem Zeitaufwand verbunden ist, weil einmal hergestellte Konjugate in Bezug auf Antigenspezifität und DNA-Sequenz festgelegt sind und jede Anwendung somit die spezielle Synthese eigener Direktkonjugate erfordert. Stattdessen wird eine Methode benötigt, die es erlaubt, spezifische Primärantikörper rasch und in präparativ-einfacher Weise mit einem DNA-Marker-Fragment zu verknüpfen.

Dieses Problem wird durch das in Patentanspruch 1 genannte Verfahren gelöst, in dem oligomere Molekülkomplexe als Reagenzien zur Markierung beliebiger spezifischer Primärantikörper verwendet werden.

Grundlage der vorliegenden Erfindung ist die überraschende Beobachtung, daß die Herstellung der erfindungsgemäßen oligomeren DNA-Protein-Konjugate hochgradig reproduzierbar verläuft, wenn diese unter geeigneten Reaktionsbedingungen durch Selbstorganisation aus Bindemolekül-modifizierten Nucleinsäuren (z. B. Biotin-derivatisierter DNA) und für das Bindemolekül spezifische Proteine (z. B. Streptavidin) hergestellt werden. Die Voraussetzung hierfür ist, daß die Nucleinsäuren zumindest an jeweils beiden Enden mit Bindemolekülen derivatisiert sind, und daß die Proteine zumindest zwei Bindungsstellen für das Bindemolekül besitzen. Durch geeignete Reaktionsbedingungen läßt sich erreichen, daß die durch Selbstorganisation gebildeten DNA-Protein-Komplexe end- oder mittelständige freie Bindungsstellen aufweisen, an die weitere funktionelle, Bindemolekül-modifizierte Modulartormoleküle (z. B. Antikörper, Rezeptoren, Haptene, Chromophore, Metallkolloide etc.) gebunden werden können. Hierdurch werden weitere Funktionseinheiten an die einmal gebildeten DNA-Protein-Komplexe angekoppelt, um z. B. eine spezifische Bindung an Zielstrukturen zu erreichen. Auch können weitere Bindemolekül-modifizierte DNA- oder RNA-Einzelstränge mit komplett oder partiell homologer oder auch vollständig nichtkomplementärer Sequenz in die Reaktion eingeführt werden, um oligomere DNA-Protein-Konjugate mit speziellen Eigenschaften zu erzeugen.

Die erfindungsgemäßen DNA-Protein-Konjugate besitzen aufgrund ihrer oligomeren Natur einen Verstärker-Effekt, der speziell für Sekundär-Reagenzien vorteilhaft ist, weil er die anschließenden Signalkaskaden und damit die Sensitivität des Nachweisverfahrens insgesamt wesentlich zu steigern vermag. Ein weiterer überraschender Vorteil der oligomeren DNA-Protein-Konjugate ist ihre im Vergleich zu den Einzelreagenzien stark verminderte unspezifische Bindung an Reaktionsgefäße sowie an die immobilisierten Proteinbestandteile, offenbar eine Konsequenz der geringen unspezifischen Adsorptionseigenschaften des Streptavidins und anderer günstiger Eigenschaften dieser Molekülklasse. Weiterhin erwiesen sich die erfindungsgemäßen DNA-Protein-Komplexe überraschenderweise als gut lagerbar, so daß sie als Universalreagenzien für die Immuno-PCR und andere immunologische Nachweisverfahren deren zuverlässige Standardisierung und einfache Durchführung erlauben. Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist in Patentanspruch 6 gegeben, in dem die oligomeren DNA-Protein-Komplexe zur Markierung von Bindemolekül-derivatisiertem Antikörper verwendet werden, der im Zuge einer Immuno-PCR an Festphasen-immobilisiertes Nachweismolekül bindet. Hierdurch entfallen langwierige Kopplungsschritte wie sie z. B. in der Immuno-PCR-Technik nach Zhou et al. notwendig sind. Zusätzlich ergibt sich wegen der oligomeren Natur der DNA-Protein-Komplexe ein beachtlicher Verstärkereffekt.

Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist in Patentanspruch 12 gegeben, in dem die oligomeren DNA-Protein-Komplexe zunächst beispielsweise mit einem Antikörper modifiziert werden. Das so erhaltene supramolekulare Aggregat bindet direkt an Festphasen-immobilisiertes Nachweismolekül, ohne daß aufwendige multiple Kopplungsschritte erforderlich sind. Vorteilhaft sind hierbei neben der einfachen experimentellen Handhabung und des Verstärkereffektes vor allem die geringe Tendenz des oligo-

meren DNA-Protein-Konjugates, unspezifisch an die Oberflächen der Reaktionsgefäße zu binden. Der Nachweis des Immunkomplexes kann direkt mittels PCR-Technik erfolgen. Alternativ kann die durch die Bindung des oligomeren Komplexes vergrößerte Masse oder weitere am oligomeren Komplex gebundene Funktionseinheiten, z. B. Fluorophore, zum Nachweis herangezogen werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Herstellung der DNA-Protein-Komplexe

Doppelt biotinylierte DNA wird durch PCR unter Verwendung zweier 5'-Biotin-markierter Primer hergestellt (Abb. 1). Das doppelt markierte PCR-Produkt wird über Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt und im Anschluß durch Ultrafiltration oder durch Fällung konzentriert. Die so erhaltene DNA wird als etwa 1 µM Stammlösung bei -20°C aufbewahrt. Zur Synthese der oligomeren DNA-Protein-Konjugate werden jeweils 2 µL dieser Stammlösung mit 18 µL 10 mM Tris-Puffer, pH 7.5, verdünnt und mit 2 µL Streptavidin-Lösung im Konzentrationsbereich zwischen 0.5 bis 50 µM, gelöst in 10 mM Tris-Puffer, pH 7.5, gemischt und vorzugsweise über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubationszeit kann aber in weiten Zeiträumen von Minuten bis hin zu mehreren Wochen variiert werden, um die Ausbeuten einzelner Konjugatcluster-Fractionen zu verändern. Proben der Inkubationslösungen werden auf einem 2%-Agarose-Gel bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Nach Anfärbung der DNA-Banden mit 0.05 µg/ml Ethidiumbromid lassen sich unter UV-Licht die charakteristischen Banden der Konjugatcluster erkennen (Abb. 2). In Spur 1 (100 Moläquivalente Streptavidin pro DNA) ist ein Fingerabdruck-ähnliches Bandenmuster zu erkennen, das die verschiedenen oligomeren DNA-STV-Konjugate repräsentiert. Während bei Überschuß an STV-Konjugate von vergleichsweise geringem Molekulargewicht entstehen, werden durch Verringerung des STV-Überschusses oligomere Konjugate mit hohem Molekulargewicht gebildet (Abb. 2, Spuren 3-5). In Gegenwart von ausgewogenen Moläquivalenzen zwischen Streptavidin und DNA bilden sich nahezu ausschließlich hochmolekulare Konjugatcluster jenseits des Molekulargewichtes von 12.2 Kilobasen (Abb. 2, Spur 4).

Beispiel 2

Herstellung Modulatormolekül-modifizierter oligomerer DNA-Protein-Konjugate

Doppelt biotinylierte DNA von nahezu beliebiger Länge, vorzugsweise jedoch 100 bis 1000 Basenpaare lang wird durch PCR unter Verwendung Biotin-markierter Vorstufen, wie Biotin-markierter Nucleotide oder Biotin-markierter Primer hergestellt. In der Praxis hat sich die Verwendung 5-Biotin-markierter Primer bewährt. Alternativ können für die Synthese der biotinylierten DNA auch enzymatisch oder chemisch-synthetisch hergestellte, Biotin-markierte, einzelsträngige Nucleinsäurefragmente eingesetzt werden. Das Biotin-derivatisierte Nucleinsäure-Produkt wird isoliert, beispielsweise über Ionenaustausch-Chromatographie (MonoQ, Pharmacia) gereinigt und gegebenenfalls durch Ultrafiltration aufkonzentriert, so daß sie, wie oben erwähnt, üblicherweise als etwa 1 µM Stammlösung bei -20°C aufbewahrt werden kann. Die Herstellung präparativer Mengen von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten erfolgt je nach gewünschter Maßstabsvergrößerung unter Beibehaltung des

in Beispiel 1 dargestellten Syntheseprotokolls bei einem molaren DNA:STV-Verhältnis von 1 : 2. Während der Inkubation, die vorzugsweise über Nacht bei 4°C erfolgt, bilden sich oligomere DNA-STV-Konjugate, die durch Gelfiltration über eine Superdex-200-Säule (Ausschlußvolumen von 600 kDa, Pharmacia) gereinigt werden. Sie eluieren im Totvolumen der Säule (Abb. 3a). Stammlösungen, vorzugsweise in der Konzentration von etwa 60 pM, werden mittels Ultrafiltration hergestellt und können bei -20°C stabil gelagert werden. Alternativ können die erzeugten oligomeren DNA-STV-Konjugate vor oder nach der Aufreinigung auch mit biotinylierten Bindungsproteinen (Modulatoren) modifiziert und auf diese Weise zusätzlich funktionalisiert werden. Hierzu fügt man dem beschriebenen Ansätzen etwa 10 Moläquivalente Biotin-markierten Modulator hinzu, beispielsweise biotinylierten Antikörper, und inkubiert mindestens eine Stunde bei 4°C. Die Isolierung und Lagerung dieser oligomeren DNA-STV-Konjugate erfolgt in gleicher Weise wie oben beschrieben.

Beispiel 3

Herstellung Modulatormolekül-funktionalisierter oligomerer DNA-Protein-Konjugate

Oligomere DNA-STV-Konjugate werden beispielsweise auf Basis eines doppelt biotinylierten 450-bp-DNA-Fragments wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben hergestellt, jedoch wird anstelle der Aufreinigung eine Funktionalisierung mit Biotin derivatisierten Komponenten vorgenommen. Dabei können so verschiedenartige Proteine eingesetzt werden wie z. B. Immunglobuline, Rezeptoren oder Enzyme, aber auch Nucleinsäuren in Form von Desoxyribonucleotiden oder Ribonucleotiden oder synthetischen Nucleinsäure-Derivaten nahezu beliebiger Größe, niedermolekulare Verbindungen wie organische Haptene, Mono-, Oligo- oder Polypeptide, Mono-, Oligo- oder Polysaccharide oder anorganische oder organische Partikel wie Metallcluster und -kolloide, Vesikel oder Micellen. Im vorliegenden Beispiel werden die oligomeren DNA-STV-Konjugate durch Umsetzung mit Biotin-markiertem, gegen Kaninchen-IgG gerichtetes Immunglobulin (IgG) von der Ziege funktionalisiert. Hierzu werden üblicherweise etwa 10 Moläquivalente, bezogen auf die eingesetzte Menge an STV, in besonderen Fällen aber auch weniger als ein bis mehr als 1000 Moläquivalente zum Rohprodukt des oligomeren DNA-STV-Konjugates gegeben. Die Inkubationszeit reicht je nach Modulator-Komponente über Zeiträume von einer Minute bis hin zu mehreren Wochen, wird jedoch üblicherweise für eine Stunde bei 4°C durchgeführt. Im vorliegenden Fall werden 30 µL einer 2-µM-Lösung von Biotin-markiertem anti-Kaninchen-IgG (Pharmingen) zum zuvor wie oben beschrieben hergestellten oligomeren DNA-STV-Konjugate gegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die entstandenen funktionalisierten oligomeren DNA-Protein-Konjugate werden durch Standardmethoden auf Basis von Filtration, Dialyse, Chromatographie oder Elektrophorese, die dem Fachmann vertraut sind, vorzugsweise jedoch im 50-mM-Kaliumphosphat, pH 7.4, Puffer über die in Beispiel 2 beschriebene Gelfiltrationschromatographie gereinigt (Abb. 3b), durch Ultrafiltration oder andere äquivalente Verfahren aufkonzentriert und als Stammlösungen bei -20°C aufbewahrt.

Beispiel 4

Verwendung von oligomeren Streptavidin-DNA-Komplexen in der Immuno-PCR

Als Antigen, das in diesem Fall mit Hilfe der Immuno-PCR nachgewiesen werden soll, dient IgG des Kaninchens. Dieses Antigen wird in üblicherweise in 1 : 10 Verdünnungsschritten auf Mikrotiterplatten immobilisiert und durch Zugabe eines biotinylierten anti-Kaninchen-IgG aus Ziege als Primärantikörper markiert. Von der Stammlösung der oligomeren DNA-STV-Konjugate, wie sie unter Beispiel 2 hergestellt wurde, werden in Reaktionspuffer D Verdünnungen von 1 : 500 hergestellt und den Ansätzen 50-µL-weise hinzugefügt. Anschließend wird die Immuno-PCR wie üblich durchgeführt. Zu Vergleichszwecken werden im parallelen Ansatz Streptavidin und biotinylierte DNA sukzessive an den biotinylierten Primärantikörper gekoppelt (Abb. 4A). Die PCR-Amplifikation der DNA und die quantitative Bestimmung der Amplifikate erfolgen mittels PCR-ELISA, wie beschrieben. Aus Abb. 4A ist klar erkennbar, daß der Signalverlauf bei Verwendung der oligomeren DNA-STV-Konjugate im Vergleich zur sequentiell durchgeführten Immuno-PCR mit einer mehr als 10-fachen Sensitivitätssteigerung einhergeht. Dies ist zum einen auf den Verstärkungseffekt durch die Bindung oligomerer DNA-Streptavidin-Konjugatcluster und zum anderen auf eine verminderte unspezifische Bindung der Cluster zurückzuführen.

Beispiel 5

Verwendung von Immunglobulin-funktionalisierten oligomeren DNA-Protein-Konjugaten als Sekundärreagenzien in der Immuno-PCR

Die Immuno-PCR mit Maus-IgG als nachzuweisendes Antigen wird im wesentlichen wie im Beispiel 4 beschrieben durchgeführt. Nach Markierung des fixierten Antigens mit einem als Primärantikörper dienenden anti-Maus-IgG des Kaninchens werden oligomere DNA-STV-Konjugate an diesen Primärantikörper gekoppelt, die mit biotinyliertem anti-Kaninchen IgG-funktionalisiert worden waren. Üblicherweise wird dieses Sekundärreagenz, das wie unter Beispiel 3 beschrieben hergestellt wird, als 1 : 500-Verdünnung in Reaktionspuffer D eingesetzt. Zu Vergleichszwecken wird im parallelen Ansatz biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörper an den unmarkierten, Antigen-gebundenen Primärantikörper gekoppelt und mit Hilfe eines oligomeren DNA-STV-Konjugates markiert (Abb. 4B). PCR-Amplifikation des Markers und quantitative Bestimmung des Amplifikats mittels PCR-ELISA erfolgen wie beschrieben. Aus Abb. 4B geht klar hervor, daß die Verwendung der Immunglobulinmodifizierten oligomeren DNA-STV-Konjugate die Sensitivität der unmodifizierten DNA-STV-Oligomere noch übertrifft. Dies ist sowohl auf den Verstärkungseffekt durch die Bindung der oligomeren DNA-Streptavidin-Konjugate als auch auf die nochmals deutlich verminderte unspezifische Bindung der oligomeren DNA-Protein-Konjugate zurückzuführen.

Beispiel 6

Verwendung oligomerer DNA-Streptavidin-Komplexe als Verstärker-Reagenzien für immunologische Nachweise

Oligomere Konjugate werden aus DNA und STV hergestellt, wobei eine der Komponenten zuvor mit einem Sonden-molekül modifiziert wurde. Als Sondenmoleküle kom-

men Enzyme, Fluorophore oder Radioisotope oder andere nachweisbare Gruppen in Frage, die am STV oder an die DNA gekoppelt werden, im vorliegenden Beispiel wird STV verwendet, das zuvor kovalent mit einem Eu-Chelat markiert wurde und deshalb mittels Zeit-aufgelöster Fluoreszenzanalyse nachweisbar ist. Im vorliegenden Beispiel wird IgG des Kaninchens als Modelantigen mit Hilfe eines two-sided ELISA nachgewiesen. Das Antigen wird üblicherweise in 1 : 10-Verdünnungsschritten auf Mikrotiterplatten immobilisiert, die zuvor mit anti-Kaninchen IgG als "Fänger-Antikörper" funktionalisiert wurden. Die Detektion des nachzuweisenden Antigens erfolgt mit Hilfe eines biotinylierten anti-Kaninchen-IgG aus Ziege als Primärantikörper. Anschließend wird, nach der unter Beispiel 2 beschriebenen Methode ein oligomeres DNA-Streptavidin-Konjugat ausgehend von doppelt biotinylierter DNA und Eu-Chelatmarkiertem Streptavidin (Wallac ADL) hergestellt und als Verdünnungen von 1 : 1000 in Reaktionspuffer D zu den Ansätzen 50-µL-weise hinzugefügt, um den biotinylierten Primärantikörper zu markieren (Abb. 5A, rechts). Zu Vergleichszwecken werden im parallelen Ansatz Eu-markiertes Streptavidin direkt an den biotinylierten Primärantikörper gekoppelt (Abb. 5A, links). Nach erfolgter Inkubation werden überschüssige Reagenzien durch Waschen entfernt; und die Fluoreszenz an einem Victor-Multilabel Counter (Wallac ADL) quantifiziert. Der in Abb. 5B gezeigte Signalverlauf läßt klar erkennen, daß bei Verwendung des oligomeren DNA-STV-Konjugates deutlich stärkere Signale und eine verbesserte Nachweisgrenze resultieren. Dies ist auf den Verstärkungseffekt durch die Bindung oligomerer Konjugate und die daraus resultierende stärkere Markierung des Antigens mit Fluorophoren sowie die verminderte unspezifische Bindung der Protein-DNA-Cluster zurückzuführen.

Beispiel 7

Verwendung von Immunglobulin-funktionalisierten oligomeren DNA-STV-Konjugaten als Massenverstärker bei der Detektion von Nucleinsäuren mittels Quarz-Mikrowaagen

Oligomere DNA-Protein-Konjugate werden als Verstärker-Reagenzien in analytischen Verfahren eingesetzt, die auf Massendetektion beruhen. Zur Demonstration werden Au(111)-beschichtete Schwingquarze mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz nach bekannten Chemisorptionsverfahren mit 5'-Thiol-modifizierten Fänger-Oligonucleotiden beschichtet. Als DNA-Protein-Konjugat wird ein nach bekannten Methoden hergestelltes kovalentes Konjugat aus DNA und Streptavidin verwendet, an das ein biotinyliertes Immunglobulin-Molekül, anti-Maus-IgG aus Ziege, als Massenverstärker gekoppelt ist (Abb. 6A). Zu Vergleichszwecken werden im parallelen Ansatz sukzessiv zunächst ein Biotin-markiertes, komplementäres Oligonucleotid und erst dann ein kovalentes Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase gekoppelt (Abb. 6B). Als Kontrolle werden Quarze verwendet, die mit einem nicht-komplementären Fänger-Oligonucleotid beschichtet wurden. Die nach den einzelnen Bindungsschritten zu beobachtende Verringerung der Resonanzfrequenz der Quarz-Mikrowaagen (Abb. 6C) repräsentiert die Massen der an der Quarzoberfläche gebundenen Moleküle. Wie aus dem Histogramm der Frequenzänderungen von Sensor- und Kontrollquarzen deutlich erkennbar, beruht die Bindung der Moleküle auf spezifischer DNA-Hybridisierung. Während die sukzessive Bindung von Oligonucleotid und Protein (Testsystem 2) im Mittel zu einer Änderung von ca. -70 Hz führt, bewirkt die Bindung des IgG-DNA-Konjugates ein etwa dreifach stärkeres Signal (Testsystem 1: DNA-IgG-Konjugat). Dies läßt sich

einerseits auf die Reduzierung der Bindungsschritte bei Verwendung des DNA-Protein-Konjugates, andererseits sich auf dessen höhere Masse zurückführen. Die Funktionalität des IgG-modifizierten DNA-Konjugates wird durch die Bindung von Maus-IgG-Antigen demonstriert (Abb. 6C: Testsystem 1: Bindung des Antigens). Die im Vergleich zum Kontrollquarz vierfach stärkere Frequenzabnahme ist auf die spezifische Bindung des Antigens durch das immobilisierte IgG-haltige DNA-STV-Konjugat zurückzuführen.

Abbildungen

Abb. 1 Präparation von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten

Abb. 2 Charakterisierung der oligomeren DNA-Protein-Konjugate

Abb. 3 Präparative Herstellung von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten

Abb. 4 Verwendung der oligomeren DNA-Protein-Konjugate in der Immuno-PCR

Abb. 5 Verwendung oligomerer DNA-Protein-Konjugate als Verstärker-Reagenz in immunologischen Detektionsverfahren

Abb. 6 Verwendung von Immunglobulin-funktionalisierten-Konjugaten als Verstärkerreagenzien in der massensensitiven Detektion von Nucleinsäuren mittels Quarz-Mikrowaagen

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1: Präparation von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten

Schematische Darstellung der Präparation von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten. Doppelt biotinylierte DNA (1) wird durch PCR unter Verwendung zweier 5'-Biotin-markierter Primer hergestellt und zur Synthese der oligomeren DNA-Protein-Konjugate mit Streptavidin (2) gemischt. Durch Selbstorganisation bilden sich oligomere DNA-Protein-Konjugate in denen das Streptavidin noch über freie Bindungsstellen (3) für Biotin verfügt. Die oligomeren Konjugate können in-situ direkt nach der Präparation, oder alternativ nach erfolgter Isolierung und Aufreinigung, weiter funktionalisiert werden, indem biotinylierte Komponenten, beispielsweise biotinylierte Antikörper (4), an das Streptavidin oder aber Nucleinsäure-spezifische Modulatoren, z. B. Diaminoplatin-Komplexe (5), gebunden werden.

Abb. 2: Charakterisierung der oligomeren DNA-Protein-Konjugate

a.) 2%ige Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse verschiedener oligomerer DNA-STV-Konjugate, hergestellt aus doppelsträngiger DNA der Länge von 86 bp (2A.), 124 bp (2B.), 169 bp (2C.) und 256 bp (2D.) und STV. Spur M: Molekulargewichtsmarker, 1 kb DNA-Ladder (Gibco); In den Spuren 1 bis 6 ist das relative Mischungsverhältnis von DNA zu STV von 1 : 100 bis 5 : 1 variiert. In den Spuren 7-9 sind zum Vergleich Proben aufgetragen, die aus monobiotinylierter DNA und STV hergestellt wurden. Das Kopplungsverhältnis DNA : STV in diesen Proben beträgt 1 : 5, 1 : 1 und 5 : 1.

Im Falle der oligomeren DNA-STV-Konjugate ist zu beobachten, daß hochmolekulare Konjugate bevorzugt bei äquimolaren Mischungsverhältnissen (Spuren 3 und 4) auftreten. Die verbleibende Biotin-Bindungsfähigkeit wird demonstriert, indem biotinylierter Antikörper zu den oligomeren DNA-STV-Konjugaten gegeben wird. Dies bewirkt eine

vollständige Retardierung des Bandenmusters, so daß nur eine einzige immobile Bande im hochmolekularen Bereich des Gels verbleibt.

Abb. 3: Präparative Herstellung von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten

A.) Chromatogramm der Gelfiltrations-Trennung eines Molekulargewichts-Standards. Die relativen Molekulargewichte der Testsubstanzen sind über den Pfeilen angegeben.

B.) Chromatogramm der Gelfiltrations-Trennung eines bis-biotinylierten DNA-Marker-Fragments der Länge von 169 Basenpaaren.

C.) Chromatogramm der Gelfiltrations-Trennung eines Immunglobulinmodifizierten oligomeren DNA-STV-Konjugates, hergestellt aus äquimolaren Mengen einer doppelt-biotinylierten 169-bp-DNA und STV. Nach erfolgter Aggregation wurde das oligomere Konjugat mit biotinyliertem Antikörper gekoppelt und das so entstandene Konjugat gefiltrationschromatographisch gereinigt. Das oligomere Konjugat (a) eluiert im Totvolumen der Säule. Die Peaks b-d repräsentieren nicht umgesetzte DNA (b), überschüssigen Antikörper (c) und Rinderserumalbumin aus dem Lagerpuffer (d).

Abb. 4: Verwendung der oligomeren DNA-Protein-Konjugate in der Immuno-PCR

Vergleich der Signalverläufe von Immuno-PCR-Nachweisreaktionen unter Verwendung von oligomeren DNA-Protein-Konjugaten als Markierungsreagenzien (a) mit konventionell durch sukzessive Inkubationsschritte durchgeführter Immuno-PCR (b) und analogem ELISA-Nachweis (c). Die Signalverläufe geben relative Signalintensitäten bezogen auf Negativkontrollen der Immuno-PCR wieder, in denen kein Antigen im Reaktionsansatz vorhanden war. A.) Nachweis von Immunglobulin aus Kaninchen als Modellantigen. Immobilisierte Antigen-Verdünnungen wurden zunächst mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG gekoppelt und anschließend entweder sequentiell mit STV und biotinylierter DNA (konventionelle Immuno-PCR, b) oder mit einem zuvor hergestellten oligomeren DNA-STV Konjugat markiert (a). Der Signalverlauf bei Verwendung der oligomeren Konjugate zeigt, daß diese Reagenzien im Vergleich zur sequentiellen Immuno-PCR eine mehr als 10-fach gesteigerte Sensitivität bewirken. Dies ist auf den Verstärkereffekt durch die Bindung oligomerer DNA-Streptavidin-Konjugate und auf eine verminderte unspezifische Bindung der Oligomere zurückzuführen. B.) Verwendung eines Antikörper-funktionalisierten DNA-Protein-Konjugates als Sekundärreagenz in der Immuno-PCR, gezeigt anhand des Nachweises von Immunglobulin aus Maus als Modellantigen. Immobilisierte Antigen-Verdünnungen wurden zunächst mit einem Primärantikörper, dann mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG gekoppelt und anschließend mit einem zuvor hergestellten oligomeren DNA-STV-Konjugat (b) markiert. In einer parallelen Meßreihe wurde ein gereinigtes Antikörper-funktionalisiertes oligomeres Konjugat (Abb. 3) zum Nachweis des an immobilisiertes Antigen gekoppelten Primärantikörpers verwendet (a). Die Signalverläufe zeigen, daß mit Hilfe der funktionalisierten oligomeren Konjugate im Vergleich zu den unmodifizierten DNA-STV-Oligomeren mehr als 10-fach gesteigerte Sensitivität und deutlich höhere Signalintensitäten erreicht werden. Dies ist auf den Verstärkereffekt durch die Bindung oligomerer DNA-Streptavidin-Konjugate und auf die verminderte unspezifische Bindung der Konjugate zurückzuführen.

Abb. 5: Verwendung oligomerer DNA-Protein-Konjugate als Verstärker-Reagenz in immunologischen Detektionsverfahren

A.) Schematische Darstellung des two-sided-ELISA-Nachweises von IgG aus Kaninchen als Modellantigen. Das Antigen wird auf Mikrotiterplatten immobilisiert, die zuvor mit anti-Kaninchen IgG als "Fänger-Antikörper" beschichtet wurden. Die Detektion des gebundenen Antigens erfolgt mit Hilfe eines biotinylierten anti-Kaninchen-IgG aus Ziege als Primärantikörper. Als Nachweisreagenz wird ein oligomeres DNA-STV-Konjugat ausgehend von doppelt biotinylierter DNA und Eu-Chelat-markiertem Streptavidin (**Abb. 5A** rechter Teil) sowie zum Vergleich kommerziell erhältliches Eu-markiertes Streptavidin direkt an den biotinylierten Primärantikörper gekoppelt (**Abb. 5A** linker Teil). Die Quantifizierung erfolgt durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung. B.) Die Signalverläufe geben relative Fluoreszenz-Signalintensitäten bezogen auf Negativkontrollen der Immuno-PCR wider, in denen kein Antigen im Reaktionsansatz vorhanden war. Der Signalverlauf zeigt, daß bei Verwendung des oligomeren DNA-Protein-Konjugates deutlich stärkere Signale und eine verbesserte Nachweisgrenze resultieren. Dies ist auf den Verstärkungseffekt durch die Bindung oligomerer Konjugate und den daraus resultierenden höheren Markierungsgrad des Antigens mit Fluorophoren sowie die verminderte unspezifische Bindung der Protein-DNA-Konjugate zurückzuführen.

Abb. 6: Verwendung von Immunglobulin-funktionalisierten Konjugaten als Verstärkerreagenzien in der massensensitiven Detektion von Nucleinsäuren mittels Quarz-Mikrowaagen

A.) Schematische Darstellung des Testsystems: Als DNA-Protein-Konjugat wird ein kovalentes Konjugat aus DNA und Streptavidin verwendet, an das ein biotinyliertes Immunglobulin-Molekül, anti-Maus-IgG aus Ziege, als Massenverstärker gekoppelt ist. Nach Bindung an auf Schwingquarzen immobilisierten Oligonucleotiden kann im weiteren eine Bindung von Antigen erfolgen. B.) Schematische Darstellung des zu Vergleichszwecken verwendeten Testsystems 2: An die Quarz-gebundenen Fänger-Oligonucleotide wird sukzessiv zunächst ein Biotin-markiertes, komplementäres Oligonucleotid und erst dann ein kovalentes Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase gekoppelt. C.) Histogramme der gemessenen Frequenzänderungen von Sensor- und Kontrollquarzen, letztere sind mit einem nicht-komplementären Oligonucleotid beschichtet. Die zu beobachtende Verringerung der Resonanzfrequenz repräsentiert die Massenzunahme durch die an der Quarz-Mikrowaage gebundenen Moleküle. Die niedrige Frequenzänderung der Kontrollquarze zeigt, daß die Bindung der Moleküle auf spezifischer DNA-Hybridisierung beruht. Während die sukzessive Bindung von Oligonucleotid und Protein zu einer Änderung von ca. -70 Hz führt (Testsystem 2), bewirkt die Bindung des IgG-DNA-Konjugates ein etwa dreifach stärkeres Signal (Testsystem 1: DNA-IgG-Konjugat). Dies läßt sich einerseits auf die Reduzierung der Bindungsschritte bei Verwendung des DNA-Protein-Konjugates, andererseits sich auf dessen höhere Masse zurückführen. Die Funktionalität des IgG-modifizierten DNA-Konjugates wird durch die Bindung von Maus IgG-demonstriert (Testsystem 1: Bindung des Antigens). Die im Vergleich zum Kontrollquarz vierfach stärkere Frequenzabnahme ist auf die spezifische Bindung des Antigens durch das immobilisierte IgG-haltige Konjugat zurückzuführen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Komplexen als Reagenzien für immunologische Nachweisverfahren, insbesondere der Immuno-PCR.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß oligomere Protein-Nucleinsäure Konjugate bestehend aus
 - a.) Nucleinsäuren, die mit mindestens zwei Bindemolekülen verknüpft sind, und
 - b.) Proteinen, die mindestens zwei Bindungsstellen für das Bindemolekül besitzen,
 als Reagenzien in immunologischen Nachweisverfahren verwendet werden.
3. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nicht alle Bindungsstellen der Proteine b) durch die mit den Nucleinsäuren a) verknüpften Bindemoleküle abgesättigt sein müssen.
4. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nucleinsäure (a) um einzel- oder doppelsträngige Desoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuren oder modifizierte artifizielle Nucleinsäuren wie Peptidnucleinsäuren, Alanypeptidnucleinsäuren, Phosphothioatnucleinsäuren oder andere Nucleinsäure-Analoga handelt.
5. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Protein (b) um Avidin, Streptavidin, Rezeptoren oder Antikörper oder andere Bindeproteine handelt.
6. Oligomere Nucleinsäureprotein-Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Bindemoleküle Biotin, Digoxigenin, Fluorescein, Dinitrophenol oder andere niedermolekulare organische Haptene wie z. B. Peptide mit spezifischer Erkennungssequenz eingesetzt werden.
7. Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Signalerzeugung bzw. Signalverstärkung in immunologischen Nachweisverfahren, insbesondere in der Immuno-PCR, verwendet werden.
8. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß weitere, Bindemolekül-derivatisierte Modulatormoleküle über die Nucleinsäure (a) oder das Protein (b) an den oligomeren Komplex gebunden sind.
9. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Bindemolekül-derivatisierten Modulatormolekülen um Antikörper, Rezeptoren, Enzyme oder andere Bindeproteine handelt.
10. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 7-8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Bindemolekül-derivatisierten Modulatormolekülen um einzel- oder doppelsträngige Nucleinsäuren wie DNA, RNA oder modifizierte artifizielle Nucleinsäuren handelt.
11. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach Anspruch 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Bindemolekül-derivatisierten Modulatormolekülen um niedermolekulare organische Verbindungen wie Pharmakophore, Chromophore, Fluorophore, Mono-, Oligo- oder Polypeptide, Mono-, Oligo- oder Polysaccharide oder biologisch-aktive Wirksubstanzen handelt.
12. Oligomere Nucleinsäure-Protein-Konjugate nach

Anspruch 7–10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Bindemolekül-derivatisierten Modulatormolekülen um Verbindungen wie Metall- und Halbmetallkolloide und Cluster, Borane, Carborane, Kohlenstoff-Allotrope wie Polyacetylene, Fullerene und Nanoröhren oder organische Vesikel oder Mizellen handelt. 5

13. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 zur Signalverstärkung in immunologischen Nachweisverfahren, insbesondere in einer Immuno-PCR. 10

14. Kompetitives immunologisches Nachweisverfahren, wobei das Nachweismolekül, das mit einem Bindemolekül verknüpft ist, zunächst mit einem oligomeren Nucleinsäure-Protein-Komplex gemäß Anspruch 1–11 inkubiert wird und anschließend eine Immuno-PCR durchgeführt wird. 15

15. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 zum Nachweis von niedermolekularen Verbindungen wie beispielsweise Hormone, pharmakologische oder pflanzenwirksame Wirkstoffe und deren Abbauprodukte oder Drogen und deren Abbauprodukte oder Wirksubstanzen anderer Art. 20

16. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 zum Nachweis von Nucleinsäuren. 25

17. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 als Verstärkerreagenz in Nachweisverfahren, die auf optischen Methoden beruhen wie beispielsweise Oberflächenplasmon-Resonanz, Reflexions-Interferenz-Spektroskopie oder Detektion mittels Reflexionsgitterkoppler, Resonanzspiegel-Sensor und analogen Techniken. 30

18. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 als Verstärkerreagenz in Nachweisverfahren, die auf massensensitiven Methoden beruhen wie beispielsweise die Detektion durch Quarz-Mikrowaagen oder Impedanzspektroskopie. 35

19. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 als Markierungs-Reagenzien für die Immun-Elektronenmikroskopie oder anderen bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise als Kontrastmittel oder Radiodiagnostika für medizinische Anwendungen. 40

20. Verwendung von oligomeren Nucleinsäure-Protein-Konjugaten nach Anspruch 1–11 als therapeutische Reagenzien für medizinische Anwendungen, beispielsweise als Radiotherapeutika, Cytostatika oder ähnliche biologisch wirksame Verbindungen. 45

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

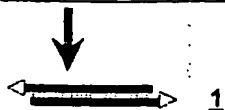
55

60

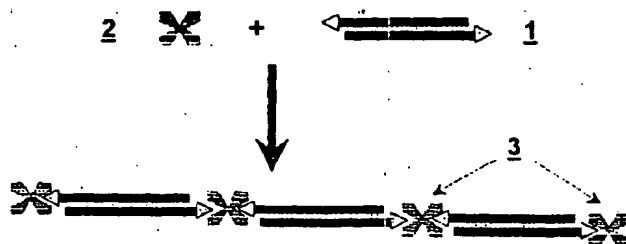
65

- Leerseite -

Abbildung 1
Präparation des doppelt funktionalisierten DNA-Markers
z.B. durch PCR mit zwei biotinylierten Primern



Präparation z.B. des Streptavidin-DNA-Komplexes
durch Mischen je eines Moläquivalentes
Streptavidin und biotinylierter DNA



Funktionalisierung des *oligomeren DNA-STV* Komplexes
a.) z.B. mit einem biotinylierten Immunglobulin 4
b.) z.B. mit Diaminoplatinkomplexen 5

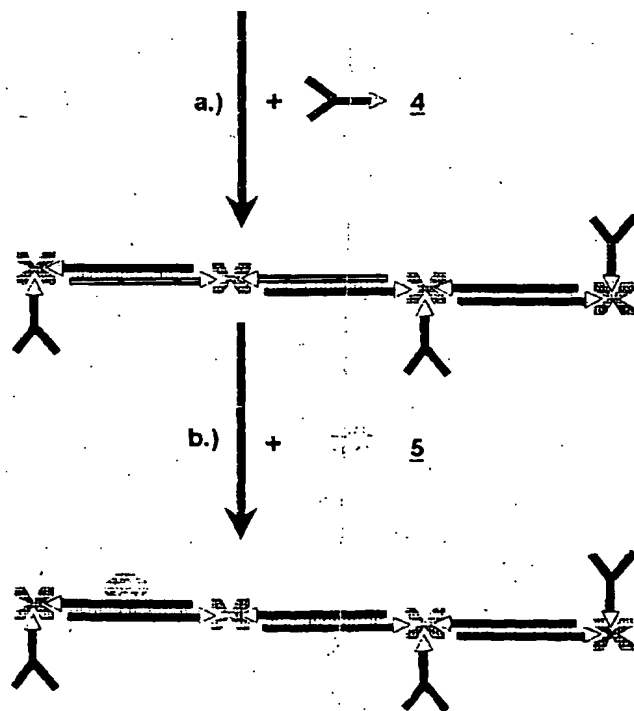


Abbildung 2

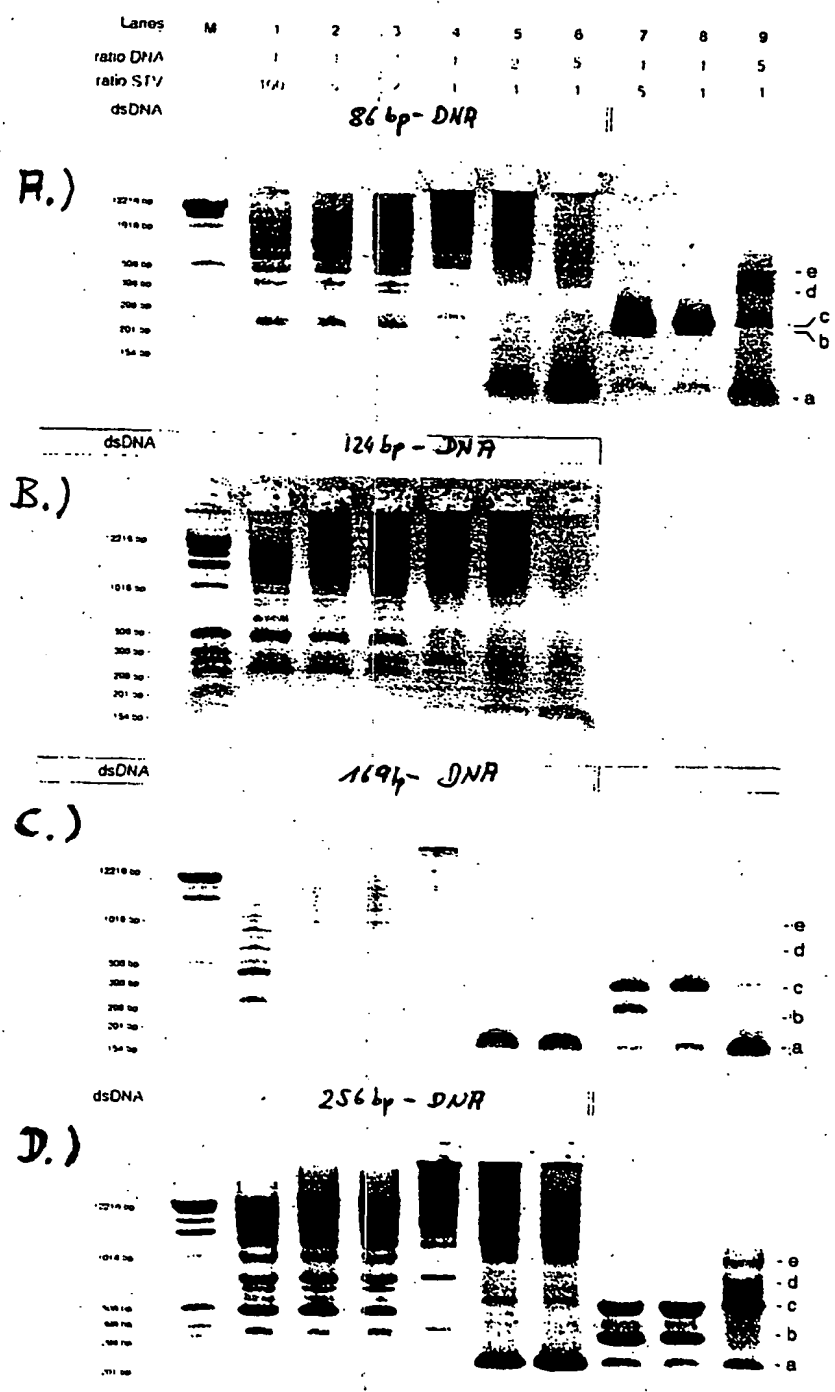


Abbildung 3

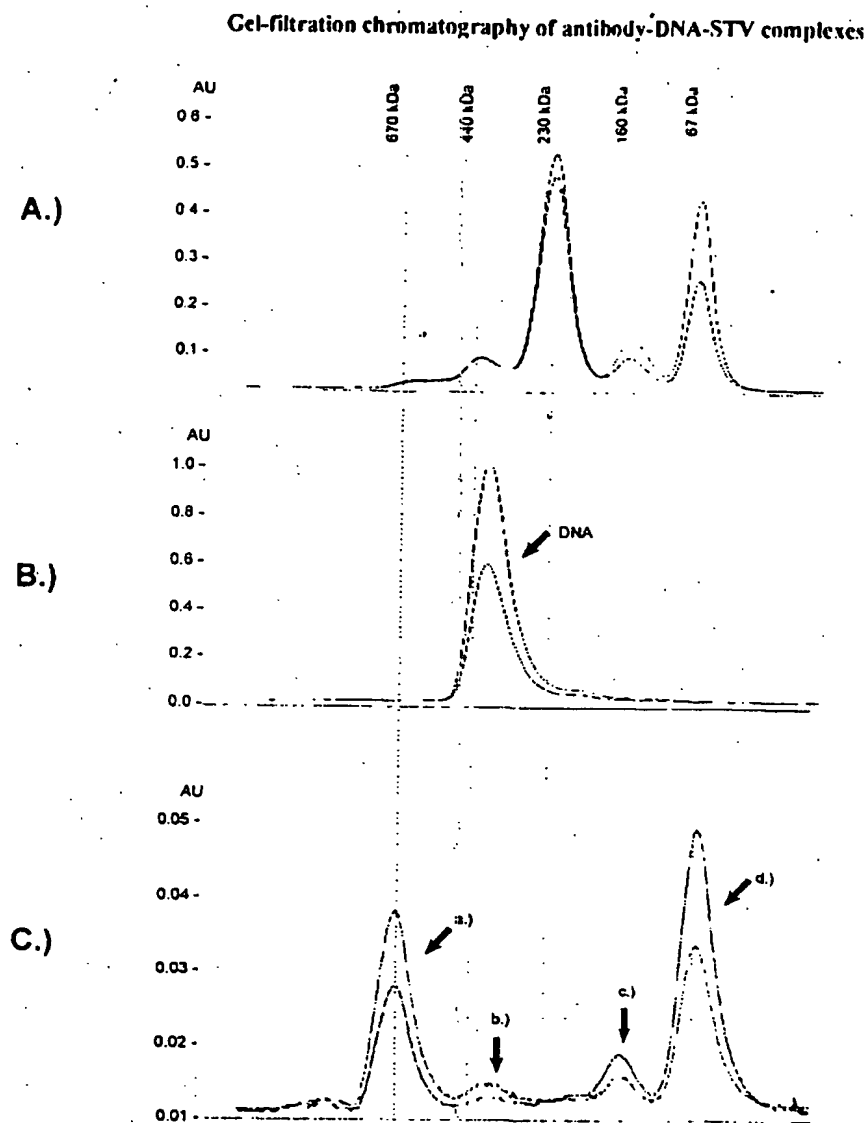


Abbildung 4

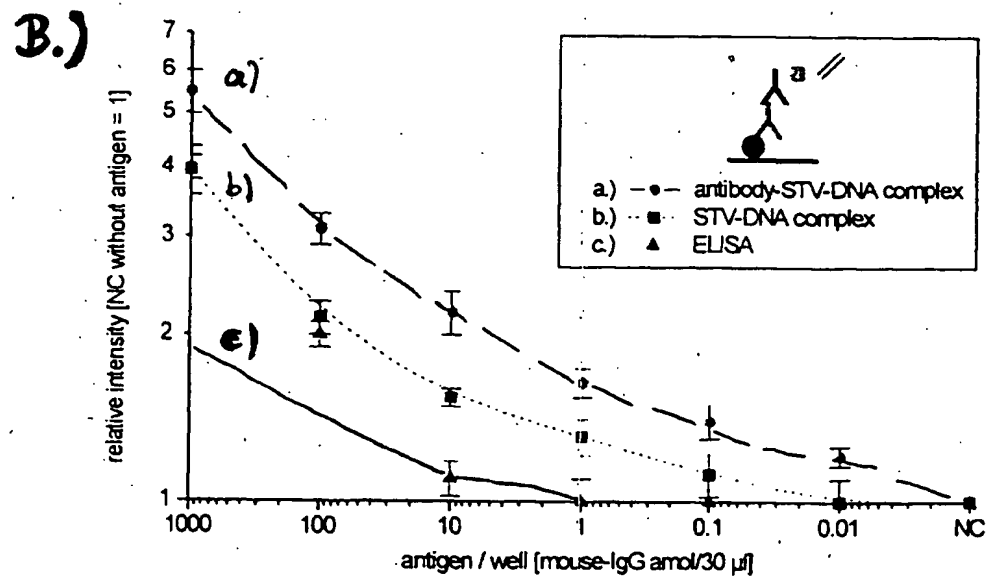
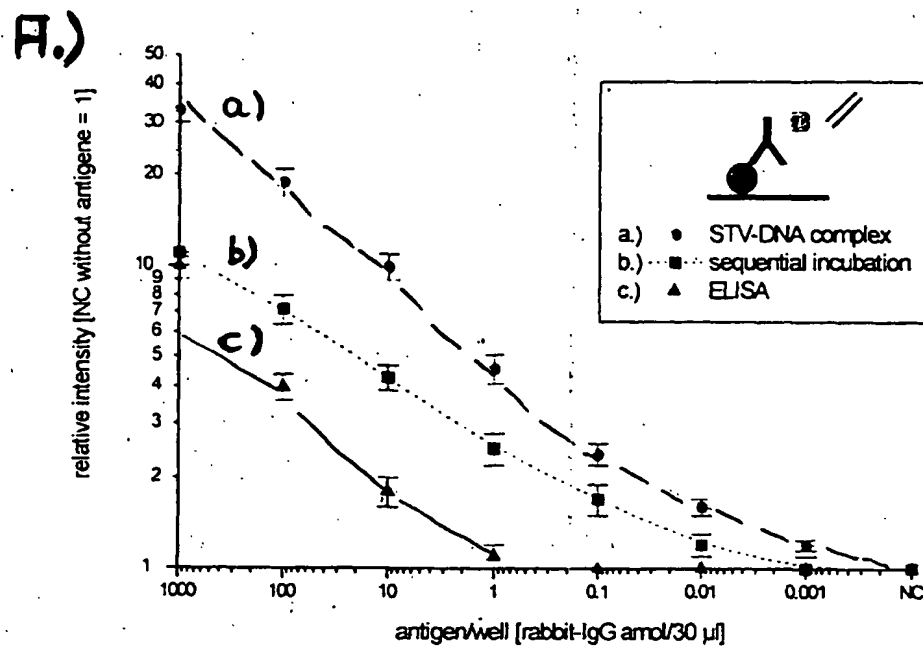
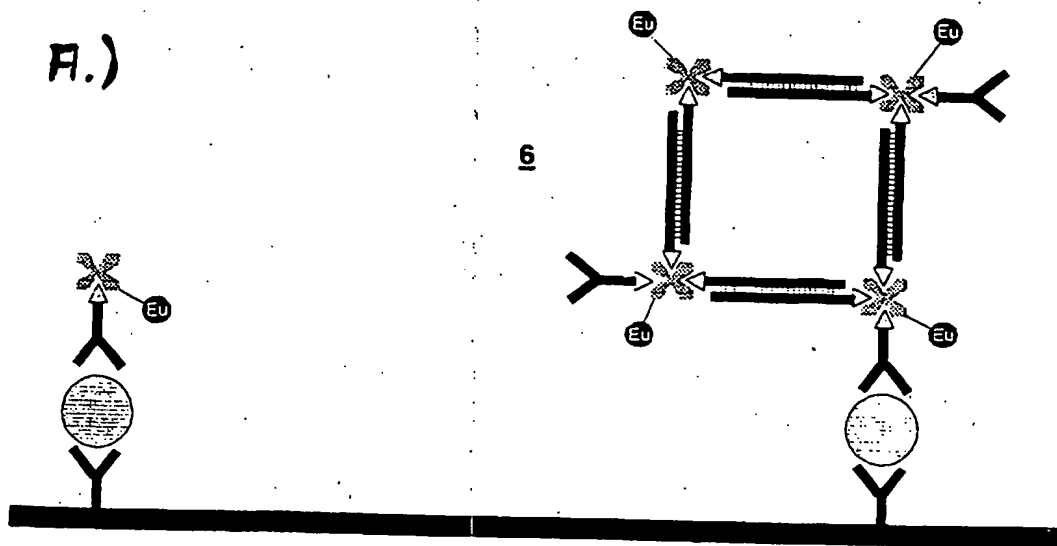


Abbildung 5

A.)



B.)

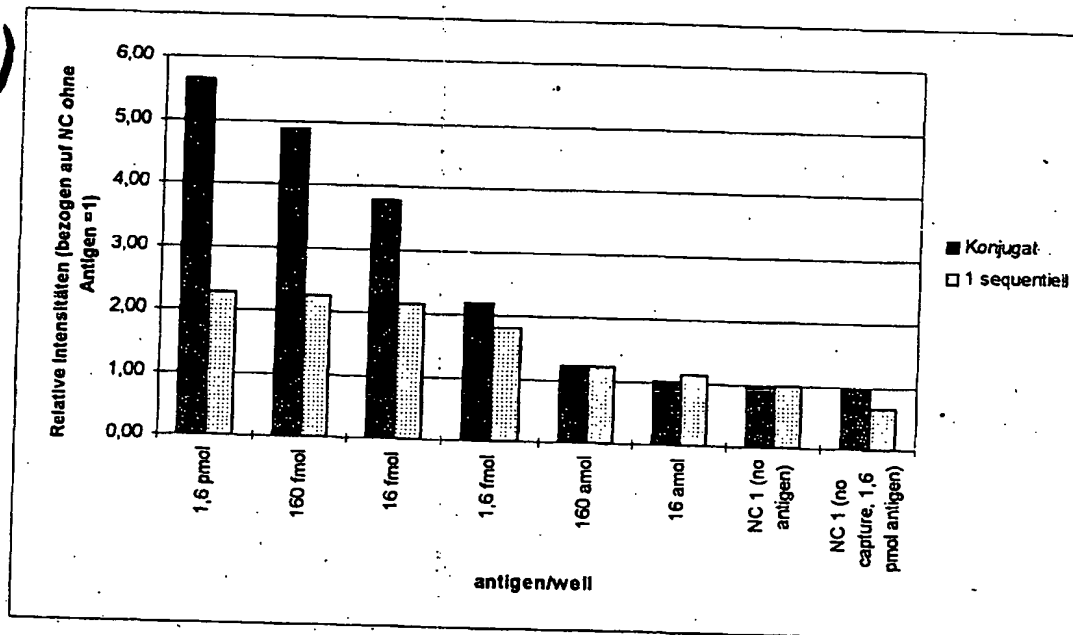
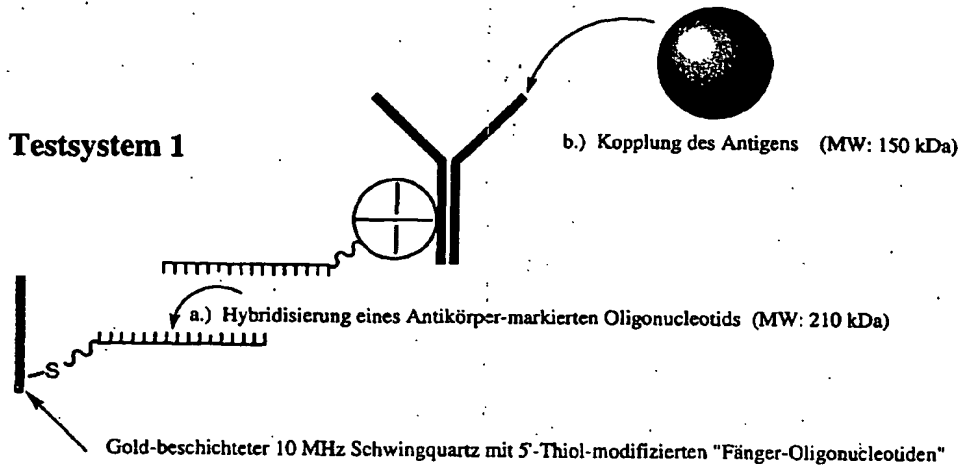


Abbildung 6

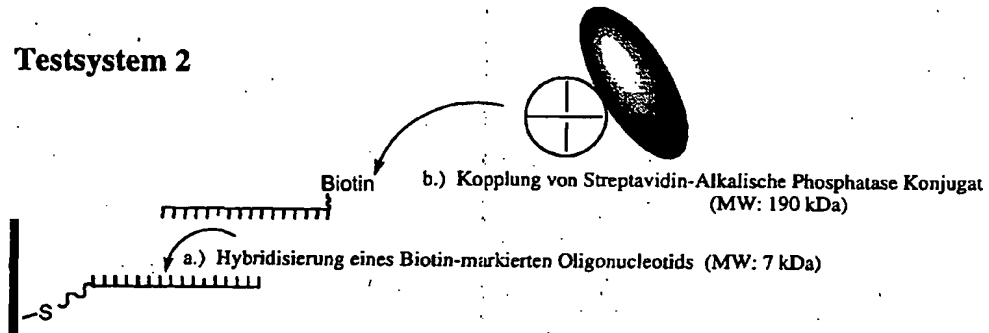
A.)

Testsystem 1

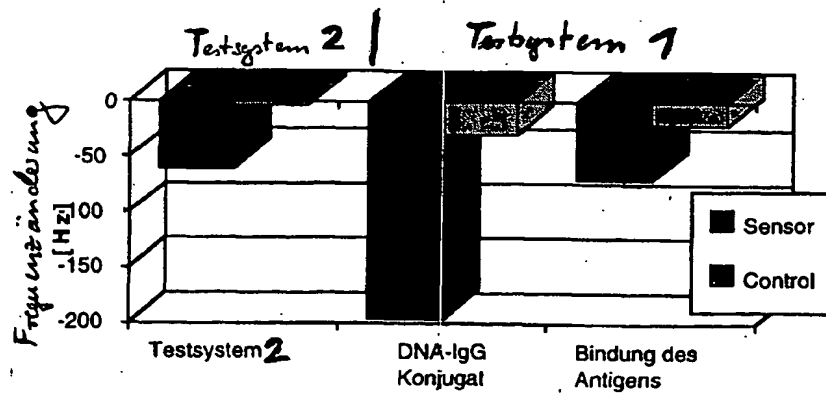


B.)

Testsystem 2



C.)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.